

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560404

研究課題名(和文)第2世代ケージド化合物による新規細胞セレクション法の開発

研究課題名(英文)Development of the Second Generation of Caged Compounds toward to New Cell Sorters

研究代表者

垣内 喜代三(Kakiuchi, Kiyomi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：60152592

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

## 研究成果の概要(和文):

本研究では、代表者らが開発した、光照射時に蛍光を発する化合物に変換される光分解性化合物を用いた、新たなケージド化合物の創成を目指した。

ホタルルシフェリンをモデル化合物とし、水溶液中での光分解反応を検討したところ、光照射時間依存的にホタルルシフェリンが元の形で再生することが確認された。一方、細胞内での光分解反応では、細胞内酵素により、光分解性化合物とルシフェリン間の結合が分解されてしまった。モデル化合物を核酸の一種であるチミジンに変更し、さらに細胞内酵素で解離しない結合様式で光分解性化合物を導入したところ、チミジンの再生が確認され、さらに、アンチセンス分子への展開にも成功した。

## 研究成果の概要(英文):

In this research, we tried to apply our novel photolabile protecting group to caged compounds. A firefly luciferin was selected as a target bioactive compound, and we examined the photodeprotection reaction of the synthesized caged firefly luciferin in water. After photoirradiation, the original firefly luciferin was released from caged compounds with increasing the irradiation time. In in vivo experiment, however, the enzyme in the cell dissociates the chemical bond (ester bond) between a firefly luciferin and a photolabile protecting group. Next, we selected thymidine as a new target compound, and synthesized caged thymidine with ether bond to suppress the bond dissociation by the enzyme. After photoirradiation to the synthesized caged thymidine, we confirmed the regeneration of thymidine. In addition, we applied caged thymidine to the caged antisense oligomer. This caged antisense oligomer enabled to recover the original function as antisense oligomer after photoirradiation.

研究分野：光生物化学

キーワード：ケージド化合物 ホタルルシフェリン ルシフェリン - ルシフェラーゼ反応 チオクロモン 蛍光 核酸 アンチセンス分子 アンケージング

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象を詳細に解明するためには、複数の分子が協調して働くネットワークを壊すことなく、そのままの状態を理解する研究手法が必要不可欠である。つまり、生命現象を担う分子であるタンパク質やシグナル分子の機能を、本来働くべき時期と場所で精密に制御することが望まれている。これを可能にする手法の一つにケージド化合物がある。ケージド化合物とは、生理活性分子に光分解性化合物を導入することで、その分子構造を変化させることにより、一時的に自身が持つ生理活性を失わせた化合物のことを指す。ケージド化合物に光照射を行うと、導入した光分解性化合物が除去され、その結果、元の生理活性分子を元の形で放出することが可能となる。このことにより、ターゲットである生理活性分子が関与するより直接的かつ精密な時間・空間情報が得られるので、細胞内外での生命現象の解明に有用な手法となりうる。ケージド化合物に用いられる光分解性保護基として、これまでにニトロベンジル系やクマリン系などが報告されているが、光吸収性や光分解性などにまだまだ大いに改良の余地が残されていた。さらに、これらの保護基を利用したケージド化合物に対して光照射を行っても、どれだけ生理活性分子が放出されたかを細胞内で定量的に評価する手法は確立されていなかった。加えて、これらの光分解性化合物に蛍光特性を付与する等のさらなる高機能化に関する研究は全く行われていなかった。

一方、研究代表者らは、新規な光分解性化合物の開発を行い、これまでにフェニルチオクロモン類が優れた光分解能を有していることを見出してきた (*Chem. Commun.* **2008**, 2103; *Synlett*, **2012**, 23, 367)。この光分解性化合物は、光照射を行うことで、対応するアルコール、アミン、カルボン酸及びリン酸をほぼ定量的に放出することが可能である。さらに、光照射前はほとんど蛍光を示さないのに対し、光照射後にはチオクロモン骨格が極めて強い蛍光 (量子収率 = 0.85) を示す化合物に変換されることも見出してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、チオクロモン型光分解性化合物を用いて、従来法と比較してより詳細に生命現象を解明できる「第2世代のケージド化合物」を創成することを目的とした。上述の通り、チオクロモン型化合物は、光照射を行い、保護された化合物を放出する際に初めて強い蛍光を発する化合物に変換される。従って、この優れた蛍光発光性を有する光分解性化合物を、上述のケージド化合物に応用すれば、蛍光特性を併せ持つこれまでにない新しいケージド化合物が創成できると期待される。このような第2世代ケージド化合物は、光照射により生理活性分子が機能を発現す

る時期と場所を高度に制御するだけでなく、チオクロモン型化合物が持つ、極めて強い蛍光性化合物に変換されるという最大の特長を活かして、その位置情報の可視化、並びに放出される生理活性物質の定量解析も期待できる。このようなケージド化合物の創成が達成されると、この強い蛍光を指標としたフローサイトメトリーによる生理活性分子が機能している細胞のみをセレクションする新しい手法の開発を目指すことも目的とした。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、以下の項目で研究を進めることとした。

- (1) 生理活性分子との連結によるケージド化合物の合成
- (2) 各種反応条件下での光分解挙動の解明
- (3) ケージド化合物の細胞内におけるアンケーシングの確認と細胞内蛍光強度の測定
- (4) 細胞内使用に適したチオクロモン型光分解性化合物類縁体の開発

まず、チオクロモン型化合物がケージド化合物へと展開できるかを検討する必要がある。そこで、数多くの生理活性分子の中から、活性の検出が容易なホタルルシフェリンを選択し、我々のチオクロモン型光分解性化合物と連結させることとした。まず、ホタルルシフェリンと効率良く連結する手法を、多様な連結部位を有する光分解性化合物の選択と反応条件を詳細に検討し、確立することを目指した。次に、合成した新規ケージドルシフェリンを用いて、まずは細胞外で光分解挙動の詳細な検討を行った。特に、分解挙動と副生する蛍光発光体からの蛍光挙動の相関についても詳細な検討を行うこととした。この知見を基に、細胞内での光分解挙動についても検討を実施することとした。さらに、細胞外、細胞内での結果を基に、必要に応じて、チオクロモン骨格の改良も行うこととした。

これらの検討が順調に進んだ場合、フローサイトメトリーを利用したアンケーシング細胞セレクション手法の確立を目指すこととした。

## 4. 研究成果

- (1) 新規ケージドルシフェリンの合成と光分解挙動の検討

ホタルルシフェリンはATP、マグネシウムイオン存在下において、ルシフェラーゼ酵素と酵素反応を起こすことで、化学発光体であるオキシルシフェリンへと速やかに変換されることが知られている。そこで、ホタルルシフェリンにチオクロモン型光分解性化合物を導入した新規ケージドルシフェリンを合成し (図 1)、それに光照射を行って、ルシフェリンの再生を促すこととした。ルシフェリンの再生は、光照射後の溶液に

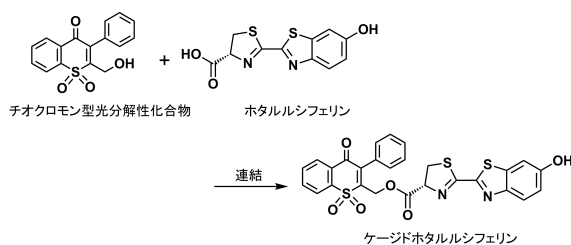


図1 ケージドホタルルシフェリンの合成

ATP、マグネシウムイオン存在下、ルシフェラーゼ酵素を添加させることで生成する、オキシルシフェリンの化学発光で確認することとした。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は酵素反応であるため、オキシルシフェリンの化学発光が観測された場合、ケージドルシフェリンから元のルシフェリンが正常な形で再生していることを容易に観察することができる(図2)。

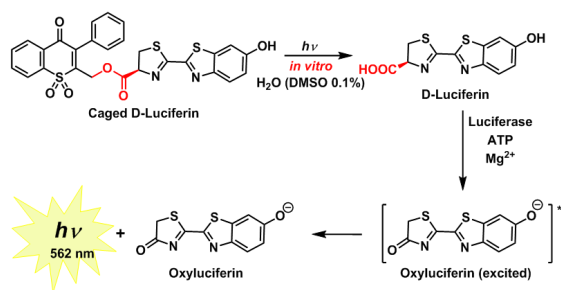


図2 ケージドルシフェリンへの光照射と再生するルシフェリンの検出

目的のケージドルシフェリンは、チオクロモン型光分解化合物とルシフェリン分子をエステル結合でつなぐことで合成する計画を立てた。種々の縮合剤を検討した結果、中程度の収率で目的のケージドルシフェリンを合成することに成功した。次に合成したケージドルシフェリンへの光照射を検討した。これまでにチオクロモン型光分解化合物を利用した検討においては、有機溶媒を用いて光照射を検討していた。しかしながら、細胞内への検討を指向した場合、光脱保護を検討するためには、水溶液中で行うことが望まれる。そこで、0.1%のジメチルスルホキシドを含む100 μM ケージドルシフェリン水溶液を調製し、細胞外での光分解挙動を検討することとした。光照射を実施後、その溶液を化学発光測定用のプレートに移し、そこへルシフェラーゼ、ATP、マグネシウムイオンを添加し、ルミノメーターを用いてオキシルシフェリンの発光量を測定した(図3)。

光照射を行う前は、遮光条件と遮光無しの条件でほぼ同じ化学発光量を示した。遮光条件でも化学発光が観測された理由としては、溶液を調製した段階で、ケージドルシフェリンの一部において加水分解反応が進行しており、既にルシフェリンが再生してしまっていたためであると予想される。しかしながら、

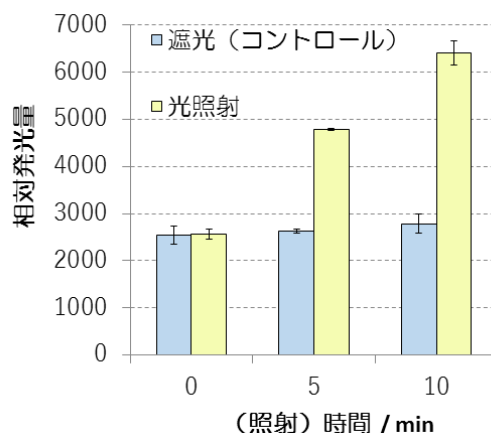


図3 各照射時間後のオキシルシフェリンの化学発光量

遮光条件においては、10分間放置しても化学発光量にほとんど変化は見られなかった。これは、この時間では加水分解反応も含めたルシフェリンの再生反応がほとんど進行していないことを意味している。一方、光照射を行った場合、照射時間が長くなるにつれて、化学発光量の増大が観測された。これは、光照射を行うことで、ケージドルシフェリンから正常な形でルシフェリンが再生していることを示しており、チオクロモン型光分解化合物を導入したケージド化合物であっても、水溶液中で光分解反応が良好に進行したことを明らかにすることができた。さらには、副生している蛍光発光体が酵素反応を阻害していないことも明らかとなった。蛍光発光体の強度からの定量的な生理活性物質の放出挙動測定については、ルシフェリン分子自体も蛍光を発することから、本モデル実験では評価できなかった。

次に、合成したケージドルシフェリンの細胞内での光分解挙動を検討した。ルシフェラーゼを安定的に発現しているヒトの肺ガン由来の細胞に、合成したケージドルシフェリンを導入した後、細胞に直接光照射を行い、ルミノメーターを用いて化学発光量を測定した。しかしながら、光照射前と照射後でいずれも化学発光が確認され、さらにその発光量はほぼ同じであった。これは、ケージドルシフェリンを細胞に導入した際、細胞内に存在するエステラーゼ酵素により、ケージドルシフェリンの加水分解反応が速やかに進行してしまったためであると考えられる。この結果から、細胞内脱保護を成功させるためには、細胞内エステラーゼにより分解される懸念をもつエステル結合を介してケージド化合物を合成するのではなく、細胞内酵素により分解される懸念の低いもしくは全く無い結合様式によりケージド化合物を合成する必要性が考えられる。本結果を受けて、合成したケージドルシフェリンを使用した細胞内光脱保護評価は困難であると判断し、これ以上の検討は実施しなかった。

## (2) 新規ケージド核酸の合成と光分解挙動の検討

(1) の検討から、チオクロモン型化合物がケージド化合物に展開できることが明らかとなった一方で、副生する蛍光発光体を用いた生理活性物質の放出挙動の定量的な評価と細胞内での脱保護評価は検討できなかった。そこで、新たなターゲット分子として核酸分子、特にチミジンに注目した。チオクロモン型光分解化合物をチミジンに導入する場合、図4に示すようにエステラーゼ酵素で分解されないエーテル結合を利用することに加え、チミジン分子自体は蛍光を飛ばさないため、蛍光測定による定量的な放出挙動の変化も評価できることが期待できる。そこで、まずチミジンの3'位と5'位をアセチル基で保護したアセチルチミジンにチオクロモン型光分解化合物を導入することを試みた。

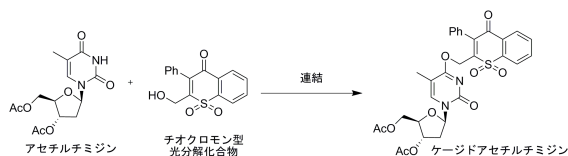


図4 ケージドアセチルチミジンの合成

種々縮合剤や溶媒を検討することにより中程度の収率ではあったものの目的のケージドアセチルチミジンの合成に成功した。そこで、合成したケージドアセチルチミジンへの照射を行い、アセチルチミジンの放出挙動について検討した。その結果、図5に示すように、照射時間が長くなるにつれて、蛍光強度が強くなっていくことが確認された。

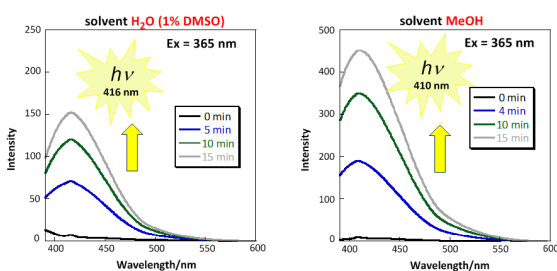


図5 ケージドアセチルチミジンへの照射時の蛍光強度変化

一方で観測された蛍光波長は、我々が予想した蛍光発光体の波長とは異なるものであった。構造と反応機構を詳細に検討した結果、合成したケージドアセチルチミジンへ照射を行うと、一度蛍光を放する中間体を生成し、その中間体にさらに照射を行うことで、元のアセチルチミジンが再生していることが明らかとなった。

当初予想した反応機構とは異なるものの、照射により蛍光が観測されるとともに、元のアセチルチミジンが再生されることが確認できたことから、ケージドアセチルチミジンを有する核酸のオリゴマーを合成し、これ

をアンチセンス分子とするケージドアンチセンス分子の開発と照射によるアンチセンス分子の放出挙動について検討を行った。

ホタルルシフェラーゼを発現する mRNA のアンチセンス分子として知られている配列のチミジン部に、我々が合成したケージドアセチルチミジンを導入した新規ケージドアンチセンス分子を業者への受託合成により合成した。得られたケージドアンチセンス分子に光を照射したところ、ケージドアセチルチミジンへの照射により観測された蛍光発光挙動と同じ挙動が観測されたことから、ケージドアンチセンス分子においても、一度蛍光を放する中間体が生成した後、元のアンチセンス分子が放出されることを示唆する結果を得た。そこで、このケージドアンチセンス分子に対し、各照射時間での照射溶液をルシフェラーゼ発現細胞に導入した後、そこへ、ルシフェリン、ATP、マグネシウムイオンを添加することで、オキシルシフェリンの化学発光量を測定した。この実験では、元のアンチセンス分子が再生した場合、ルシフェラーゼの発現が抑えられるため、観測される化学発光量は減少することが期待される(図6)。

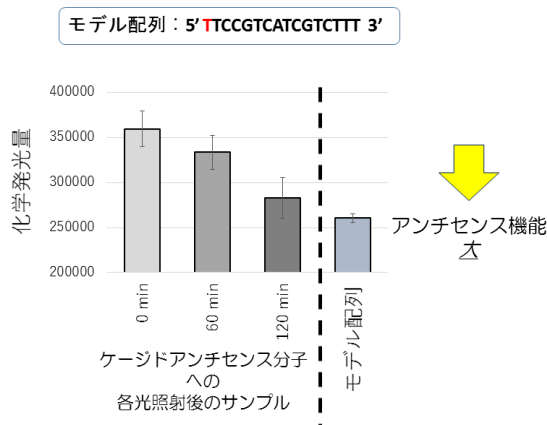


図6 各種アンチセンス分子を導入した際のオキシルシフェリンの化学発光量

図6から明らかのように、モデル配列では最も小さな化学発光量が観測され、アンチセンス分子としての機能が確認された一方、照射前のケージドアンチセンス分子は最も大きな化学発光量が観測された。これは、ケージドアンチセンス分子とすることで、アンチセンス分子としての機能を一時的に失っていることを意味している。また、照射を行うにつれて、化学発光量は減少し、120分間光を照射した際には、モデル配列とほぼ同じ化学発光量が観測された。これはケージドアンチセンス分子に光を照射することで、元のアンチセンス分子が元の機能を有して放出されることを示している。さらに、この挙動が蛍光測定の結果と同様の挙動であることから、生理活性分子の放出を蛍光測定で追跡可能であることを示すことができた。

以上、本研究では、研究代表者が開発してきた新たな光分解性化合物を種々のケージド化合物として展開可能であることを示すことができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Hiroki Tanimono, Tsumoru Morimoto, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis of novel caged antisense oligonucleotides with fluorescence property" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, In press. 査読有, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2016.01.007
2. Yasuo Sasaki, Ryo Sugiura, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimono, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and evaluation of new caged compound with thiochromone derivative" *Tetrahedron*, vol.70, 2014, pp7973-7976, 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2014.08.047

[学会発表](計21件)

1. 日影薪、佐々木康雄、西山靖浩、垣内喜代三、「チオクロモン型光解離性保護基を有する新規ケージドレスベラトロールの蛍光測定による脱保護評価」、日本化学会第96春季年会、同志社大学 京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)、2016年3月26日
2. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Evaluation of Novel Caged Nucleic Acids possessing Fluorescence Property" International Symposium for Photo- and Electro-Molecular Machines, Toulouse (France), 10/7/2015
3. Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Photodeprotection of the Caged Resveratrol with Thiochromone-type Photolabile Protecting Group" 2015年光化学討論会、大阪市立大学 杉本キャンパス(大阪府・大阪市)、2015年9月9日
4. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Evaluation of Novel Caged Antisense Oligonucleotides possessing Fluorescence Property" 2015 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Jeju (Korea),

6/28/2015

5. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Evaluation of Novel Caged Antisenseoligonucleotide possessing fluorescence property", 日本化学会第95春季年会、日本大学 船橋キャンパス(千葉県・船橋市)、2015年3月27日
6. 片桐大輔、坂口さやか、米田新、出村拓、細川陽一郎、「フェムト秒レーザーを用いた植物単細胞への巨大分子の導入」、第62回応用物理学会春季学術講演会、東海大学 湘南キャンパス(神奈川県・平塚市)、2015年3月12日
7. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis of Novel Caged Thymidine for Caged Oligonucleotide", The 8th Asian Photochemistry Conference (APC-2014), Kovalam (India), 11/12/2014
8. 佐々木康雄、久井輝巨、日影薪、西山靖浩、垣内喜代三、「蛍光特性を有する新規ケージド DNA の合成と評価」、2014年光化学討論会、北海道大学 札幌キャンパス(北海道・札幌市)、2014年10月11日
9. 久井輝巨、佐々木康雄、西山靖浩、垣内喜代三、「蛍光発光特性を有する新規ケージド化合物の創成」、日本化学会第94春季年会、名古屋大学 東山キャンパス(愛知県・名古屋市)、2015年3月28日
10. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Ryo Sugiura, Terunobu Hisai, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Evaluation of New Novel Caged Compound", 2013 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul (Korea), 11/25/2013
11. 佐々木康雄、西山靖浩、杉浦遼、久井輝巨、垣内喜代三、「チオクロモン誘導体を用いた新規ケージド化合物の合成と機能評価」、2013年光化学討論会、愛媛大学 城北地区(愛媛県・松山市)、2013年9月13日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kakiuchi/index-j.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
垣内 喜代三 ( KAKIUCHI KIYOMI )  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成  
科学研究科・教授  
研究者番号：60152592
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
細川 陽一郎 ( HOSOKAWA  
YOUICHIRO )  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成  
科学研究科・准教授  
研究者番号：20448088